

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.005

· 基础研究 ·

## 新型羧甲基壳聚糖包裹 C-藻蓝蛋白负载 CD59 配体的靶向纳米微球的制备及其对 HeLa 细胞的杀伤作用

殷启凤<sup>1</sup>, 杨鹏<sup>2</sup>, 王玉娟<sup>1</sup>, 李冰<sup>1</sup> (1. 青岛大学医学部 生物学教研室, 山东 青岛 266021; 2. 陕西省宝鸡市妇幼保健院 遗传室, 陕西 宝鸡 721300)

**[摘要]** **目的:** 制备一种新型的 C-藻蓝蛋白(C-phycoerythrin, C-PC) 靶向纳米微球(nanometer microspheres, NPs), 并探究其对 HeLa 细胞的靶向治疗作用。**方法:** 采用离子交联法制备靶向羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC) 纳米载药颗粒 C-PC/CMC-NPs; 响应面优化法筛选出最佳制备条件, 并用透射电镜、激光粒度仪观察纳米载药颗粒的表征; MTT 法检测靶向纳米颗粒 C-PC/CMC-CD59sp-NPs 对宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响; 溶血实验检测 C-PC/CMC-CD59sp-NPs 的组织相容性及安全性; Western blotting 和免疫组化法分别检测 C-PC/CMC-CD59sp-NPs 对 HeLa 细胞内活化的 Caspase-3/PARP 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达的影响。**结果:** 成功制备 C-PC/CMC 纳米微球, 透射电镜观察到纳米微球呈现出规则的球形, 分散均匀, 其粒径约为 160 nm。最佳制备条件: 羧甲基壳聚糖浓度为 2.0 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> 浓度为 1.0 mg/ml, 粒径约为 120 nm 的球形, 包封率为 (62 ± 5)%; CMC 与 C-PC 投药量为 3:1, 载药量为 (20 ± 3)%; C-PC/CMC-NPs 体外表现出缓释特征, 在 120 h 内 pH = 5.4 和 7.4 条件下, 释放率分别达到 80% 和 60%; 同时未出现溶血现象。C-PC/CMC-CD59sp-NPs 对 HeLa 细胞增殖有明显的抑制作用, 促进活化的 Caspase-3/PARP 蛋白的表达, 抑制 Bcl-2 蛋白的表达(均  $P < 0.05$ )。**结论:** 新型靶向纳米药物 C-PC/CMC-CD59sp-NPs 能在体外抑制 HeLa 细胞的生长, 诱导其凋亡。为海洋药物的研发提供了新的思路, 对靶向纳米药物的进一步研究提供理论基础。

**[关键词]** 藻蓝蛋白; 靶向纳米微球; 羧甲基壳聚糖; HeLa 细胞

**[中图分类号]** R737.33; R979.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)02-0127-07

## Preparation of novel nanoparticles of carboxymethyl chitosan covered with C-phycoerythrin carrying CD59sp and its killing effect on HeLa cells

YIN Qifeng<sup>1</sup>, YANG Peng<sup>2</sup>, WANG Yujuan<sup>1</sup>, LI Bing<sup>1</sup> (1. Department of Biology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong, China; 2. Department of Genetics, Maternal and Child Health Care Hospital of Baoji City, Baoji 721300, Shaanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare C-phycoerythrin (C-PC) contained polymeric nanoparticles with targeting ligand and study its target treatment effect on HeLa cells. **Methods:** The targeting drug-loading carboxymethyl chitosan (CMC) nanoparticles were synthesized by ionic-gelation method, and the particles with the most optimal condition were selected by orthogonal analysis. The surface morphology and particles size were observed by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). The effects of nanoparticles on the proliferation of HeLa cells were assessed by MTT assay. The tissue compatibility and safety of nanoparticles were studied by hemolysis assay. The expression of cleaved Caspase-3 and Bcl-2 was determined by Western blotting and immunofluorescent staining, respectively. **Results:** The optimal condition for the preparation of the nanoparticles was: CMC at 2.0 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> at 1.0 mg/ml, and the nanoparticles size of about 120 nm with spherical morphology; the entrapment efficiency was (62 ± 5)%; the ratio of CMC:C-PC was 3:1, and drug-loading amount was (20 ± 3)%. The drug-loading nanoparticles showed slow release characteristic in

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81471546, No. 81001346)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81471546, No. 81001346)

**[作者简介]** 殷启凤(1992-), 女, 硕士生, 主要从事靶向抗肿瘤研究, E-mail: yin264823@126.com

**[通信作者]** 李冰(LI Bing, corresponding author), 博士, 副教授, 主要从事肿瘤靶向治疗研究, E-mail: libing\_516619@163.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170120.1117.010.html>

vitro and without hemolysis. The nanoparticles significantly inhibited the proliferation of HeLa cells and induced the cell apoptosis; in addition, it promoted the expressions of cleaved Caspase-3 protein but suppressed the expression of Bcl-2 protein. **Conclusion:** The novel targeting CPC nanoparticles could inhibit HeLa cell growth, with a superior apoptosis inducing effect over the other drugs, which provided a new idea for the research on marine drugs and an important theoretical value for further study on targeting drug-loading nanoparticles.

[ **Key words** ] C-phycoerythrin; targeting nanoparticles; carboxymethyl chitosan; HeLa cell

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24(2): 127-133. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.005 ]

肿瘤严重威胁着人类的生命健康,许多抗癌药物因不良反应大、新陈代谢快、体内半衰期短等因素严重降低了药物的有效作用。纳米技术与医药的结合为肿瘤的治疗开辟了新的途径<sup>[1-2]</sup>。C-藻蓝蛋白(C-phycoerythrin, C-PC)是一种普遍存在于螺旋藻中的天然光合辅助色素蛋白,其具有安全、无毒、水溶性好、抗氧化、抗病毒、清除自由基等作用,被广泛用于食品、保健药品、染料等工业领域<sup>[3-5]</sup>。此外,有研究<sup>[6-7]</sup>发现,C-PC可以增强机体的免疫力和抑制肿瘤的生长,但其稳定性差,在体内易被蛋白酶降解等因素限制了其在抗肿瘤方面的应用。壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然的、可再生、无毒的、生物相容性和降解性好的氨基碱性多糖,其缺点是水溶性较差。羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC)是壳聚糖的一种衍生物,在保留壳聚糖优良特性的基础上,具有良好的水溶性<sup>[8]</sup>。因此以CMC为药物载体,可实现药物的缓释、延长药物疗效、减少药物副作用,并提高药物的稳定性。CD59是一种膜补体调控蛋白,有研究<sup>[9]</sup>发现,其在多种实体瘤中高表达,而在正常细胞中低表达,CD59可以有效结合CD59特异性的配体肽(CD59sp),以实现了对肿瘤细胞的靶向定位。本研究通过离子交联法,将C-PC包裹在CMC中,并在其表面连接上CD59sp,制备出C-PC/CMC-CD59sp靶向纳米微球(nanometer microspheres, NPs),对其表征进行评价,同时检测其对HeLa细胞凋亡的影响,揭示其抗肿瘤的作用机制,为C-PC抗肿瘤应用提供实验依据,为天然海洋药物的开发提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人宫颈癌 HeLa 细胞株、小鼠成纤维细胞 L929 细胞株均由本实验室保种,C-PC 购自台州宾美生物有限公司,CMC 购自青岛弘海生物技术有限公司,CD59sp 由中肽生化有限公司合成,, Bcl-2 抗体、活化的 PARP/Caspase-3 抗体购于 abcam 公司。兔抗人一抗、HRP-羊抗兔/IgG 二抗、SABC 免疫组化试

剂盒、β-actin 购于武汉博士德生物工程有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒、抗荧光猝灭封片液购于碧云天生物有限公司,ECL 化学发光试剂盒购于 Thermo Scientific 公司。透射电镜(JEM-1200EX)购自日本电子株式会社(JEOL),激光粒度分析仪(WJL-608)购自上海仪电物理光学仪器有限公司,微孔板检测仪(Synergy™ H1)购于 Biotek 公司。

### 1.2 制备 C-PC/CMC-NPs 及优选最佳制备条件

采用离子交联法<sup>[10]</sup>制备 CMC 包封 C-PC-NPs。将不同浓度的 CMC 和 C-PC 溶液在磁力搅拌器上充分混匀,以 CaCl<sub>2</sub> 作为交联剂,过夜搅拌后,制得 C-PC/CMC-NPs。

采用三因素三水平 Box-Behnken 设计的响应面优化法<sup>[11]</sup>(Design Expert 软件设计分析),以包封率作为评价指标,研究影响纳米微球形成的 3 个因素: CMC 和 C-PC 的质量比(X1)、CMC 浓度(X2)、CaCl<sub>2</sub> 浓度(X3),每个因素设置 3 个水平。见表 1。

表 1 C-PC/CMC 的质量比及水平设置

Tab. 1 Mass ratio and levels of C-PC/CMC

Factors	Range and levels		
	-1	0	1
X1: CMC/C-PC( m/m )	1:1	3:1	5:1
X2: CMC[ ρ <sub>B</sub> /( mg · ml <sup>-1</sup> ) ]	1	2	3
X3: CaCl <sub>2</sub> [ ρ <sub>B</sub> /( mg · ml <sup>-1</sup> ) ]	0.5	1.0	1.5

### 1.3 制备靶向纳米微球 C-PC/CMC-CD59sp-NPs

取 C-PC/CMC 纳米微球 5 mg 重悬于 PBS 中,充分混匀,加入 2 mg 的偶联剂 EDC,调 pH = 5.6,在室温下搅拌 1 h,8 500 × g 离心 10 min,除去溶液中未反应的 EDC,沉淀重悬在 1 ml PBS 中,加入 1 mg/ml 的 FITC 标记的 CD59sp,搅拌过夜,离心除去溶液中未结合的 CD59sp,沉淀重悬于 1 ml 的 PBS 中,4 ℃ 保存。

### 1.4 检测纳米粒表征

#### 1.4.1 透射电镜观测 C-PC/CMC 纳米微球形态

取 C-PC/CMC-NPs 悬液,于超声波清洗仪中超声分散 10 min,然后用微量滴管将分散均匀的样品滴在铜网上,让其沉降 10 min,滤纸吸去多余的液体,使其充分干燥后,在电镜下观察纳米微球形态。

1.4.2 测定 C-PC/CMC-NPs 粒径 取 C-PC/CMC-NPs 混悬液适量,用激光粒度分析仪测定其粒径大小及分布。

1.4.3 测定 C-PC/CMC-NPs 包封率 取 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 C-PC 溶液 0、0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 ml,加 PBS 溶液至 1 ml。取各管 200  $\mu\text{l}$  于 96 孔板,每组 3 个平行孔,于激发光 590、644 nm 处测定荧光强度。以 Y: 荧光强度(a. u.)对 X: C-PC 浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )进行线性回归,在 1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内线性关系良好,其回归方程<sup>[12]</sup>为  $Y = 59.911X - 150.91$  ( $R^2 = 0.9994$ )。将制备好的纳米微球溶液于 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000  $\times g$  离心 15 min,取上清液测定 C-PC 的荧光强度,代入标准曲线,根据浓度和上清液体积计算为包封的 C-PC 量。包封率按以下公式计算:包封率( $\%$ ) =  $(m_{\text{总}} - m_{\text{上清}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ ,其中  $m_{\text{总}}$  代表初始加入的 C-PC 质量, $m_{\text{上清}}$  代表游离的 C-PC 质量。

1.4.4 计算 C-PC/CMC-NPs 载药量 将 C-PC/CMC-NPs 经冷冻干燥机过夜干燥后,在电子天平上精确称量其质量,根据以下公式计算载药量:载药量( $\%$ ) =  $(W_{\text{总}} - W_{\text{上清}}) / W_{\text{纳米球}} \times 100\%$ ,其中 W 纳米球代表 C-PC/CMC-NPs 的量。

1.4.5 计算载药纳米微球体外缓释量 采用透析扩散法,在 pH = 7.4 和 5.4 条件下,将含 2 mg 的 C-PC/CMC-NPs 的重悬液放置在透析袋中,并放入含有 10 ml PBS 的离心管中,于 37  $^{\circ}\text{C}$  水平恒温振荡器上以恒定速度进行释放。分别在 1、4、8、12、24、48、120 h 时将加入的 10 ml PBS 全部取出,测量荧光强度,补全离心管中 PBS 体积。根据荧光强度计算出释放的 C-PC 量,得出累计释放率,绘制释放曲线。

1.5 MTT 法检测纳米药物对 HeLa 细胞的增殖作用

MTT 实验分为 5 组:阳性对照组(无任何处理)、阴性对照组[1% (v/v) Triton-X-100 处理]、C-PC 组(C-PC 溶液)、C-PC/CMC-NPs 组(非靶向纳米药物)、C-PC/CMC-CD59sp-NPs 组(靶向纳米药物)。人宫颈癌 HeLa 细胞株、小鼠成纤维细胞 L929 细胞株(正常细胞对照组)在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。选取对数期 HeLa 细胞,取 100  $\mu\text{l}$  按  $1 \times 10^7$  / 孔接种于 96 孔培养板中,孵育过夜。将不同浓度药物(1、10、50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )处理 HeLa 细胞,每组 5 个

复孔,培养 48 h 后,各孔加入 20  $\mu\text{l}$  的 5  $\text{mg}/\text{ml}$  MTT,继续培养 4 h 后,吸去培养液,各孔加 150  $\mu\text{l}$  DMSO,震荡 10 min,酶标仪检测 490 nm 处光密度( $D$ )值,计算出各组的存活率。存活率( $\%$ ) =  $D_{\text{样品}} / D_{\text{对照}}$ ,其中  $D_{\text{样品}}$  代表药物处理组的  $D$  值, $D_{\text{对照}}$  代表阳性对照组的  $D$  值。

1.6 溶血法检测纳米药物的安全性

溶血实验分组:阳性对照组(Triton-X-100 处理)、阴性对照组(PBS 处理)、C-PC 组(C-PC 溶液)、C-PC/CMC-NPs 组(非靶向纳米药物)、C-PC/CMC-CD59sp-NPs 组(靶向纳米药物)。将新鲜人体全血用 0.9% 氯化钠溶液稀释 10 倍,混匀,1 500  $\times g$  离心 5 min,除去上清液。沉淀的红细胞用 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次后,配制成 5% 的细胞悬液。每组 1 ml 的细胞悬液中分别加入 0.4 ml 不同浓度的药物(1.00、0.05、0.10、0.05、0.02、0.01  $\text{mg}/\text{ml}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$  水浴摇床孵育 2 h,然后 3 000  $\times g$  离心 10 min,取上清液。在酶标仪 540 nm 检测  $D$  值,计算溶血率<sup>[13]</sup>。溶血率( $\%$ ) =  $(D_{\text{样品}} - D_{\text{阴性对照}}) / (D_{\text{阳性对照}} - D_{\text{阴性对照}})$ ,其中  $D_{\text{样品}}$ 、 $D_{\text{阳性对照}}$ 、 $D_{\text{阴性对照}}$  分别代表药物处理组、Triton-X 组、PBS 组的  $D$  值。

1.7 Western blotting 法检测纳米药物对 HeLa 细胞内活化的 Caspase-3 蛋白表达的影响

实验分组:对照组(培养基)、C-PC 组(C-PC 溶液)、C-PC/CMC-NPs 组(非靶向纳米药物)、C-PC/CMC-CD59sp-NPs 组(靶向纳米药物)。HeLa 细胞经 200  $\mu\text{l}$  药物处理 48 h 后,离心收集悬浮及贴壁细胞,冰上裂解细胞 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\times g$  离心 20 min,分离蛋白与杂质,取上清,BCA 法测蛋白浓度。SDS-PAGE 分离目的蛋白,转移至 PVDF 膜上,封闭 2 h,加入 apoptosis cocktail(活化的 Caspase 3/PARP/Procaspase-3, muscle actin)一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,室温孵育 HRP-二抗 2 h,化学发光显影,Image J 图像软件分析条带灰度计算蛋白表达量。

1.8 免疫荧光法检测纳米药物对 HeLa 细胞内 Bcl-2 蛋白表达的影响

实验分组:对照组(培养基)、C-PC 组(C-PC 溶液)、C-PC/CMC-NPs 组(非靶向纳米药物)、C-PC/CMC-CD59sp-NPs 组(靶向纳米药物)。HeLa 细胞爬片后,各组药物 200  $\mu\text{l}$  处理 48 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min,4% 多聚甲醛室温固定 10 min,0.1% Triton X-100 处理 20 min,PBS 洗涤,10% 羊血清室温封闭 30 min,接着 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育 Bcl-2 一抗,PBST 洗涤,室温避光孵育 FITC 标记的二抗 1 h,PBST 洗涤,荧光显微镜下观察,拍照,IPP 软件分析荧光强度。

### 1.9 统计学处理

采用 OriginPro 8、GraphPad Prism5、Image J 处理图像, 利用 SPSS13.0 统计软件分析数据, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 制备 C-PC/CMC-NPs 优选模型成功

在三因素三水平(表 1)的 BBD 设计中, 共有 15 个实验组, 以包封率(encapsulation efficiency, EE)为响应值, 结果(表 2)显示出实验值和预测值。通过 Design-Expert 软件进行二次响应面回归分析, 得到如下多元二次响应面回归模型:  $EE(\%) = -44.96875 + 16.50000 \times X1 + 67.00000 \times X2 + 1.36667 \times X3 + 0.62500 \times X1 \times X2 + 0.06667 \times X2 \times X3 - 3.03125 \times X1^2 - 17.62500 \times X2^2 - 0.02611 \times X3^2$ 。

表 2 C-PC/CMC-NPs 优选模型组合设计及实验结果  
Tab.2 C-PC/CMC-NPs optimization model design and experiment result

Run order	Levels of independent factors			Response EE(%)	
	X1	X2	X3	Predicted	Actual
1	5:1	2	0.5	48.13	48
2	3:1	2	1.0	66.00	67
3	3:1	1	0.5	44.13	44
4	3:1	2	1.0	66.00	66
5	5:1	3	1.0	37.00	37
6	1:1	3	1.0	36.25	36
7	1:1	1	1.0	38.00	38
8	3:1	2	1.0	66.00	65
9	1:1	2	1.5	47.88	48
10	5:1	1	1.0	33.75	34
11	3:1	3	0.5	42.88	43
12	3:1	3	1.5	42.88	43
13	1:1	2	0.5	49.88	50
14	5:1	2	1.5	46.13	46
15	3:1	1	1.5	40.13	40

此模型的方差分析见表 3, 从表中可以看出, 模型在  $\alpha = 0.01$  水平上, 回归显著( $F = 551.92, P < 0.01$ ), 模型的确定系数  $R^2 = 0.9986$ , 校正后  $R^2 = 0.9968$ , 表明二次模型很好地拟合不同制备条件下纳米微球的 EE 率, 失拟项不显著( $P > 0.05$ ), 从而说明了该方程对数据实现了很好的拟合。对其实验设计优化, 最终确认的最优组合为:  $X1 = 3:1$ 、 $X2 = 2.0$ 、 $X3 = 1.0$ ; 其 EE 率为 65%, 载药率为 20%。

### 2.2 通过 C-PC/CMC-NPs 偶联制备靶向纳米微球 (Target-NPs)

以最优组合制备出 C-PC/CMC-NPs (Drugs-NPs)。由于 CD59 在多种实体瘤表面高表达, 以此为靶点, 选择 CD59<sub>sp</sub> 作为靶向分子。通过 EDC 的活化, 将其偶联在 C-PC/CMC-NPs 上, 制备成 Target-NPs。图 1 为 C-PC/CMC 纳米微球的透射电镜图, 纳米微球呈现出规则的球形, 分散均匀, 其粒径约为 160 nm; 图 2 为纳米微球在激光粒度仪测量下的粒径及分布, 粒径约为 220 nm, 分散系数小于 0.3。

### 2.3 偏酸性环境纳米微球体外释药增加

在不同 pH 条件的 PBS 缓冲液中, C-PC/CMC 纳米微球总体实现了缓释(图 3)。pH = 7.4 和 pH = 5.4 两种缓释曲线均显示出 3 个阶段: 在最初的 6 h 内, 快速释放, 主要为吸附在微球表面的药物释放; 至 80 h 时, 释放过程缓慢, 由于载体材料的降解, 释放出包埋在内部的药物, 实现平稳释放。最终在 120 h 内, 在 pH = 5.4 和 pH = 7.4 条件下, 释放率分别达到 80% 和 60%。因此, 药物的释放也表现出 pH 敏感性, 在偏酸性环境下释放的量更多。

### 2.4 Target-NPs 有效抑制 HeLa 细胞的增殖

MTT 法检测各纳米微球在不同浓度下对人类正常宫颈上皮细胞和 HeLa 细胞的抑制情况。结果(图 4)表明均对细胞的生长有抑制作用。Target-NPs 的抑制效果高于其余组, 并且随着药物浓度的增加, 抑制作用更为明显。Target-NPs 与对照组 L929 细胞相比(图 5), 各个浓度下的药物对 HeLa 细胞均展示出更高的毒性, 但药物对于正常细胞毒性作用较小。

### 2.5 溶血值测定 Target-NPs 具有好的安全性

药物通过血液到达肿瘤细胞, 因此评估药物在血液中的安全性极为重要。溶血测定以溶血值来表示, 值越低表明越安全。结果(图 6)显示, 各个药物组溶血值差异不明显, 没有发生明显的溶血现象, 表明 Target-NPs 是安全的。

表 3 药物包封率二次多项式模型方差分析  
**Tab.3 ANOVA for the fitted quadratic polynomial model for EE**

Source	Degree of freedom	Sun of Squares	Mean Square	F Value	P
Model	8	1 655.75	206.97	551.92	0.0 001
Lack of fit	4	0.25	0.06	0.06	0.9 877
Pure error	2	2.00	1.00		
Cor total	14	1 658.00			

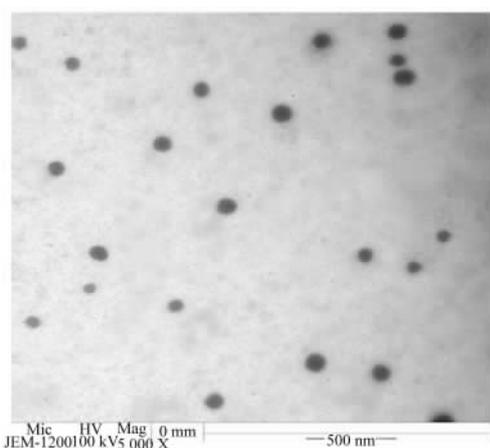


图 1 C-PC/CMC 纳米微球透射电镜图 ( × 50 000 )  
**Fig.1 Morphology and particle size of C-PC/CMC-NPs by TEM ( × 50 000 )**

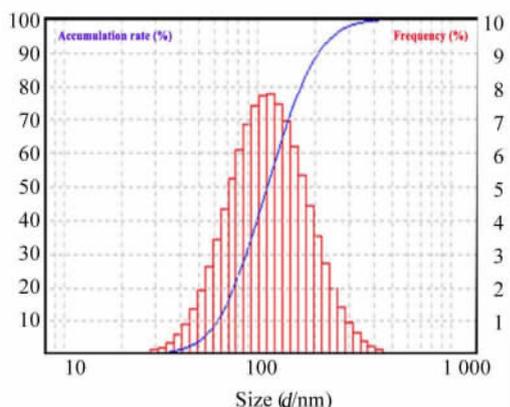


图 2 C-PC/CMC 纳米微球粒径分布

**Fig.2 Particle size distribution of C-PC/CMC nanoparticles**

### 2.6 Target-NPs 提高 HeLa 细胞中 cleaved Caspase-3 的表达

Western blotting 检测结果(图 6)显示。与对照组相比, C-PC、Drugs-NPs、Target-NPs 组活化的 Caspase-3 的表达量均明显升高(  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  ),而 Target-NPs 组的表达量又明显高于 C-PC 和

Drugs-NPs 组,同时活化的 PARP 的表达量也相应的升高。结果表明,给药组均能促进活化的 Caspase-3 蛋白的表达,靶向纳米微球促进作用更为显著。

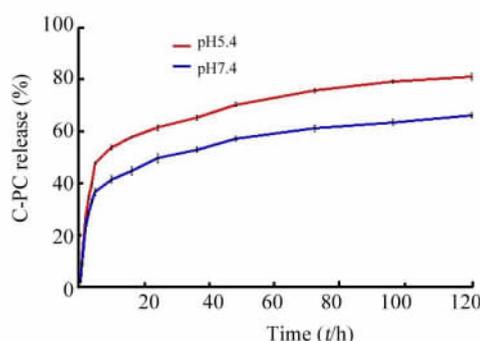


图 3 C-PC/CMC 纳米微球在不同 pH 条件下 C-PC 的释放曲线  
**Fig.3 The release curve of C-PC from C-PC/CMC-NPs at different pH**

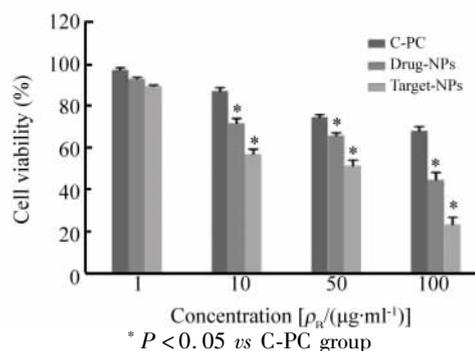


图 4 MTT 法检测不同浓度靶向纳米微球抑制 HeLa 细胞的增殖能力

**Fig.4 The proliferation of HeLa cells with different concentration of targeting nanoparticles observed by MTT assay**

### 2.8 Target-NPs 能降低 HeLa 细胞 Bcl-2 蛋白的表达量

Bcl-2 是一种凋亡调控蛋白,通过阻止细胞色素 C 从线粒体中的释放来抑制细胞的凋亡。结果(图

8)显示,与对照组相比,其余各组的表达量均有明显的下降(  $10.5 \pm 0.6, 8.1 \pm 0.6$  vs  $14.5 \pm 0.4$ ,  $P < 0.05$  ),而 Target-NPs 组更为明显(  $2.9 \pm 0.4$  vs  $14.5 \pm 0.4$ ,  $P < 0.01$  )。

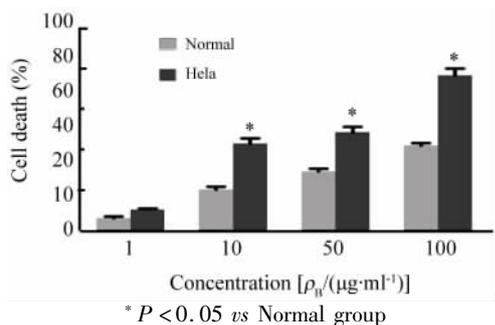


图5 MTT 法检测不同浓度靶向纳米微球对正常宫颈细胞毒性作用小

Fig. 5 The toxic effect of different concentration of targeting nanoparticles on normal cervical cells detected by MTT assay

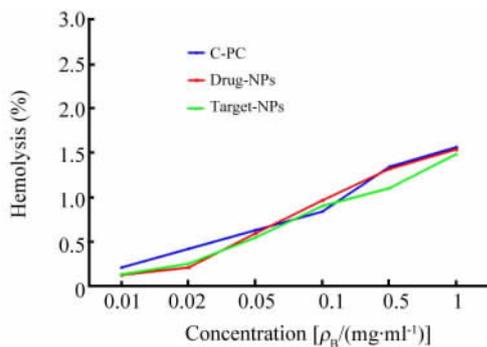


图6 靶向纳米微球不同浓度的溶血值比较

Fig. 6 Comparison of hemolysis ratio under different concentrations of targeting nanoparticles

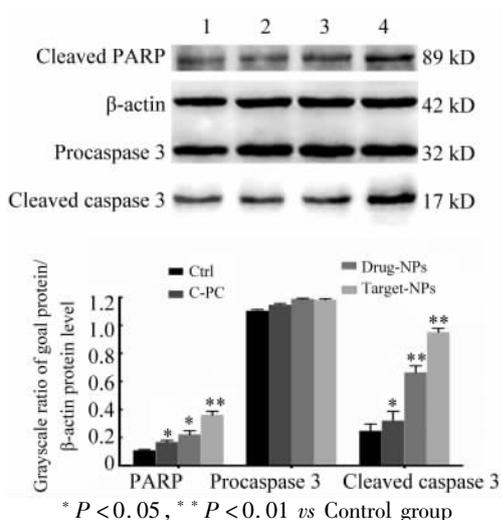
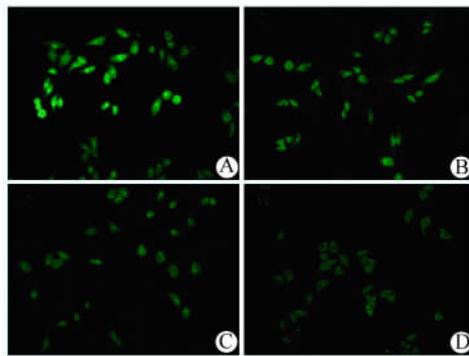


图7 Western blotting 检测 HeLa 细胞中活化的 Caspase-3/PARP 蛋白的表达量

Fig. 7 Expressions of cleaved Caspase-3/PARP in HeLa cells by Western blotting



A: Ctrl group; B: C-PC group; C: Drug-NPs group; D: Target-NPs group

图8 靶向纳米微球对 HeLa 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平的影响 (  $\times 200$  )

Fig. 8 Effect of targeted nanoparticles on the expression level of Bcl-2 protein in HeLa cells (  $\times 200$  )

### 3 讨论

近年来,纳米技术与生物医学的结合,推动药物研发进入了一个新的阶段。靶向纳米缓释药物,通过纳米粒将多种物质(核酸、多肽、蛋白质、化疗药物、光敏性分子、荧光探针分子等)定向输送到靶向位点,实现药物利用最大化,毒副作用最小化。

壳聚糖是一种由甲壳素脱乙酰化而来的多糖,在自然界中的含量仅次于纤维素,是第二丰富的天然高分子聚合物,但不溶于水。*O*-CMC 是一种壳聚糖衍生物,具有良好的水溶性、生物相容性、组织亲和性、抗菌性等特性,在化妆品、医药等方面的应用越来越多。由于其无毒,良好的生物相容性和可降解性,使得 *O*-CMC 被作为纳米药物的良好载体。*O*-CMC 通过吸附或包裹药物,并能稳定存在于中性水溶液中,使得药物活性得到保留,延缓药物释放,促进药物吸收。Snima 等<sup>[14]</sup>采用离子交联法制备了包载二甲双胍的羧甲基壳聚糖纳米粒,细胞实验证实了其纳米药物对胰腺癌细胞具有明显的毒性作用。Maya 等<sup>[15]</sup>采用  $\text{CaCl}_2$  作为交联剂,离子交联法制备了以 EGFR 作为靶点,*O*-CMC 包埋紫杉醇的靶向性纳米粒,证实了其可以靶向治疗 EGFR 过表达的肿瘤。

本课题组前期研究<sup>[16]</sup>发现,C-PC 具有抗肿瘤和增强机体免疫的功效,但稳定性差限制了其在医药领域的应用。结合纳米生物医药技术,本研究以 C-PC 为抗肿瘤药物, $\text{CaCl}_2$  作为交联剂,采用离子交联法制备包载 C-PC 的羧甲基壳聚糖纳米微球。本课题组之前还发现 CD59 分子在多种实体瘤中过表达,可作为肿瘤治疗的靶点,并在前期筛选出其特异性配体肽。EDC 可以活化 *O*-CMC 的羧基,形成酰胺键,直接与氨

基反应。利用 EDC 的活化, 将 CD59<sub>sp</sub> 连接到纳米微球上, 制备出靶向纳米药物。实验结果表明, 纳米微球具有良好的分散性, 激光粒度仪测定其粒径大约 220 nm, 电镜观察呈球形, 粒径大约 100 nm。两种粒径测量结果的不同, 可能是由于测量介质的不同, 电镜的样品需要干燥, 导致纳米微球的脱水, 使其粒径变小, 而激光粒度仪是在溶液中测量的。测得包封率为 65%, 载药量为 20%, 具有明显的缓释作用, 未产生溶血现象。MTT 实验结果表明, 药物均有抑制了 HeLa 细胞的增殖, 靶向纳米微球效果更为明显。因此说明, 该纳米药物中 C-PC 的活性被保留, 并且提高了药物的靶向作用效果。

肿瘤的发生与细胞的异常凋亡存在密切关系, 而凋亡信号转导是细胞发生凋亡的关键, Caspase 蛋白酶家族在细胞凋亡中起关键作用<sup>[14]</sup>。Caspase 蛋白酶家族诱导的细胞凋亡途径包括外源性和内源性两大类, 但最终都是通过活化 Caspase-3 引起细胞的凋亡。活化的 Caspase-3 蛋白可能作用于 DNA 修复的相关蛋白 PARP, 而 PARP 与 DNA 修复、基因完整性监护有关。在凋亡启动时, 活化的 Caspase-3 剪切 PARP, 导致其氨基酸的两个结合 DNA 的锌指结构与羧基端的催化结构域分离, 进而丧失其正常功能<sup>[17]</sup>。本研究利用 Western blotting 法检测了药物作用前后 HeLa 细胞的相关凋亡蛋白的表达情况, 发现活化的 Caspase-3 和活化的 PARP 蛋白与对照组相比, 都促进了凋亡蛋白的高表达, 靶向纳米组更为显著。由此说明, 药物的不同形式均能诱导 HeLa 细胞凋亡的发生, Target-NPs 组对肿瘤的凋亡作用更为明显。因此, 纳米药物诱导 HeLa 细胞发生凋亡的分子机制可能是: 先通过细胞的胞吞作用摄入细胞内部, 然后 O-CMC 逐渐降解, 释放出 C-PC, 进而通过促进 Caspase-3 的活化, 作用于 PARP, 实现其诱导细胞的凋亡。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] COUVREUR P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future[ J ]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65( 1 ): 21-23. DOI:10.1016/j. addr. 2012. 04. 010.

[ 2 ] JEE J P, NA J H, LEE S, et al. Cancer targeting strategies in nanomedicine: design and application of chitosan nanoparticles [ J ]. *Curr Opin in Solid State and Materials Sci*, 2012, 16( 6 ): 333-342. DOI:10.1016/j. cosms. 2013. 01. 002.

[ 3 ] PLEONSIL P, SOOGARUN S, SUWANWONG Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycoyanin and their protective effects on human erythrocytes[ J/OL ]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 60: 393-398[ 2016-07-29 ]. <http://www. sciencedirect. com/ science/ article/ pii/ S0141813013003449>. DOI: 10. 1016/ j. ijbiomac. 2013. 06. 016.

[ 4 ] KIM J A, KIM S K. Bioactive peptides from marine sources as potential anti-inflammatory therapeutics[ J ]. *Curr Protein Pept Sci*, 2013, 14( 3 ): 177-182. DOI:10.2174/13892037113149990039.

[ 5 ] KUDDUS M, SINGH P, THOMAS G, et al. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin [ J/OL ]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 742859[ 2016-07-29 ]. <https://www. hindawi. com/journals/ bmri/ 2013/ 742859/>. DOI: 10.1155/2013/742859.

[ 6 ] 李冰, 张学成, 高美华, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白和多糖的抗肿瘤免疫活性研究[ J ]. *中国海洋大学学报( 自然科学版 )*, 2004, 34( 3 ): 396-402. DOI:10.3969/j. issn. 1672-5174. 2004. 03. 008.

[ 7 ] 李冰, 褚现明, 高美华. 藻蓝蛋白-光动力疗法治疗小鼠 HeLa 细胞瘤的免疫和凋亡机制研究[ J ]. *中国激光医学杂志*, 2011, 20( 1 ): 1-6, 65.

[ 8 ] NARAYANAN D, JAYAKUMAR R, CHENNAZHI K P. Versatile carboxymethyl chitin and chitosan nanomaterials: a review [ J ]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2014, 6( 6 ): 574-598. DOI:10.1002/wnan.1301.

[ 9 ] LI B, GAO M H, CHU X M. Molecular mechanism of a novel CD59-binding peptide sp22 induced tumor cells apoptosis[ J ]. *J Cell Biochem*, 2012, 113( 12 ): 3810-3822. DOI:10.1002/jcb.24258.

[ 10 ] ANITHA A, SREERANGANATHAN M, CHENNAZHI K P, et al. In vitro combinatorial anticancer effects of 5-fluorouracil and curcumin loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles toward colon cancer and in vivo pharmacokinetic studies[ J ]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 88( 1 ): 238-251. DOI:10.1016/j. ejpb. 2014. 04. 017.

[ 11 ] YU Y, LU Y, BO R, et al. The preparation of gypenosides liposomes and its effects on the peritoneal macrophages function in vitro[ J ]. *Int J Pharm*, 2014, 460( 1/2 ): 248-254. DOI:10.1016/j. ijpharm. 2013. 11. 018.

[ 12 ] SOBIECHOWSKA-SASIM M, STON-EGIERT J, KOSAKOWSKA A. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria-an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods[ J ]. *J Appl Phycol*, 2014, 26( 5 ): 2065-2074. DOI:10.1007/s10811-014-0244-3.

[ 13 ] LI M, SONG W, TANG Z, et al. Nanoscaled poly( L-glutamic acid)/doxorubicin-amphiphile complex as pH-responsive drug delivery system for effective treatment of nonsmall cell lung cancer [ J ]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5( 5 ): 1781-1792. DOI: 10.1021/am303073u.

[ 14 ] SNIMA K S, JAYAKUMAR R, UNNIKRIISHNAN A G, et al. O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for metformin delivery to pancreatic cancer cells[ J ]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89( 3 ): 1003-1007. DOI:10.1016/j. carbpol. 2012. 04. 050.

[ 15 ] MAYA S, KUMAR L G, SARMENTO B, et al. Cetuximab conjugated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for targeting EGFR overexpressing cancer cells[ J ]. *Carbohydr Polym*, 2013, 93( 2 ): 661-669. DOI:10.1016/j. carbpol. 2012. 12. 032.

[ 16 ] 李冰, 褚现明, 高美华, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白诱导 HeLa 细胞凋亡的分子机制研究[ J ]. *中国药理学通报*, 2009, 25( 8 ): 1045-1050. DOI:10.3321/j. issn:1001-1978. 2009. 08. 016.

[ 17 ] 睦文妍, 陈春燕, 罗招阳, 等. PARP-1 和 Caspase-3 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[ J ]. *南华大学学报( 医学版 )*, 2010, 38( 2 ): 210-213. DOI:10.3969/j. issn. 2095-1116. 2010. 02. 018. 1

[ 收稿日期 ] 2016 - 09 - 26

[ 修回日期 ] 2016 - 11 - 04

[ 本文编辑 ] 王映红